

## Részletes szakmai beszámoló

### Bevezető

Kutatásaink legfőbb célkitűzése a fehérjefeltekeredés tanulmányozása volt, amit alkalmasan megválasztott modellrendszerek, különböző méretű és eltérő belső dinamikájú fehérjék vizsgálatán keresztül valósítottunk meg. Az atomi szintű képalkotást lehetővé tevő kísérletes (NMR-spektroszkópia és röntgenkristallográfia) és elméleti (kvantumkémiai számítások és bioinformatika) módszerek segítségével kívántunk a fehérje „folding” problematikájának jobb megértéséhez hozzájárulni. A szintetizált vagy bakteriális rendszerek segítségével előállított fehérjék szerkezeti és dinamikai paramétereinek meghatározását követően olyan újabb variánsokat terveztünk, majd állítottunk elő, melyek konformációs tulajdonságai a tervezett irányba mozdultak el. Ennek a cél-racionális és iteratív folyamatnak köszönhetően esetenként rendezett fehérjéket még rendezettebbé, más esetekben viszont belsőleg rendezetlen fehérjéket még rendezetlenebbé tettünk. A vizsgált mini- (pl. Tc5b, SGCI), moduláris (CCP, SH2, DLC ...) és funkcionálisan rendezetlen fehérjék (kalpasztatin, ERD14, P25,...) téralkatának feltérképezése, valamint belső mozgásuk explicit jellemzése lehetővé tette a makromolekulák biológiai szerepének jobb megértését. A biokompatibilis poliamid rendszerek racionális tervezése során nem csak mutánsokat (alfa-L-aminosavval helyettesítjük a natív szekvencia egyes elemeit), de variánsokat (pl. foszforilált-aminosavat tartalmazó), valamint „foldamer” elemeket terveztünk és szintetizáltunk. Ez utóbbi esetekben elsősorban béta-aminosavak és béta-peptidek beépíthetőségét tartottuk szem előtt és azt, hogy egy-egy ilyen lokális (pontoszerű) módosítás a fehérje primer szekvenciájában milyen térszerkezeti következményt indukálhat. Eredményeink 33 angol nyelvű közleményben adtuk közre (IF=116,984), elérhetővé tettük a világhálón, valamint több mint 40 hazai és nemzetközi tudományos fórumon és konferencián mutattuk be.

### A tudományos eredményeink rövid ismertetése:

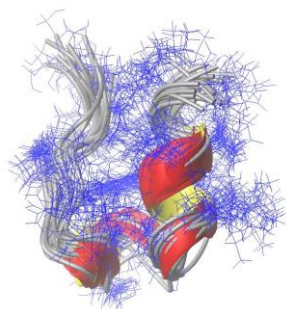
A kisebb és közepes mérettartományba eső fehérjék (5-100kDa) jelentős hányada, a riboszómán történt szintézisüket követően spontán és autonóm módon veszi fel 3D téralkatát. Nagy jelentőséggel bír a bioaktivitás hordozásában mind a fehérjék 3D térszerkezete, mind azok széles időskálán történő belső mozgása. Bár több mint 50 éve a kutatás homlokterében található a lineáris poliamid rendszerek, tehát a polipeptidek és fehérjék fel- és letekeredésének problematikája, az eredmények és erőfeszítések ellenére még mindig számos alapvető kérdést nem sikerült megválaszolni. Úgy tűnik, hogy a megértéshez vezető egyik út éppen a fehérje méretének további csökkentésén át vezethet. Ezért a szokásos, „állatorvosi lóként” aposztrofált ubikvitinnél (70-80 aminosav) is kisebb, spontán módon feltekeredő fehérjéket keresve találtunk rá részben a különböző proteáz-inhibitorokra (pl. SGCI, SGTI, 35-40 aminosav), részben az ezeknél is kisebb, mindössze 20 aminosavból álló Tc5b típusú minifehérjékre. A méretcsökkentést tovább folytatva, a fehérjéket felépítő másodlagos szerkezeti elemek (hélixek, redők, coiled-coil elemek, stb.) stabilitásának és dinamikájának jellemzésére is kiterjedt kutatómunkánk.

- 1) A két kisméretű proteáz-inhibitor molekula korábbi NMR vizsgálataihoz kapcsolódóan a belső mozgékonyosságuk megértéséhez elvezető úgynevezett dinamikus térszerkezeti sokaságokat állítottunk elő. Az NMR kísérleti adatok (S2 és NOE) alapján generált térszerkezeti családok segítségével megállapítottuk, hogy a proteázzal való kölcsönhatás során úgynevezett konformer szelekció történik. (Gáspári és mts. 2010/1) (Dhir és mts. 2010) Rendszereinket vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy egyes NMR-spektroszkópiából származtatható paraméterek dinamikai vonatkozásait fel lehet használni a téralkat-családok helyes megállapítására. Javaslatot tettünk a hagyományos „szerkezet-hatás” (Structure-Activity Relationships, SAR) összefüggések dinamikai aspektussal való kibővítésére, a „Dynamic Structure-Activity Relationships” (röviden DSAR) fogalom megalkotására. (Gáspári és Perczel 2010) Kimutattuk, továbbá hogy a belső dinamikát tükröző fehérje-térszerkezeti sokaságok esetében a bioinformatikai elemzés sikere jelentősen függ attól, hogy mely konformereket és milyen metodikával választunk ki az analízis során. (Gáspári és mts. 2010/2)

A Diabetes Melitus kezelése kapcsán közismerté vált Exenatid gyógyszer rövidítése és racionális átszabása során kapott, csupán 20 aminosavból felépülő minifehérjék kutatása terén számos mutáns és variáns kémiai szintézisét és biokémiai expresszióját valósítottuk meg. Megvizsgáltuk a kialakuló úgynevezett „Trp-kalitka” stabilitását és belső mozgékonyágát a primer szekvencia függvényében. (Rovó és mts. 2011) Többek között

kidolgoztunk egy olyan  $^{15}\text{N}$  (és vagy  $^{13}\text{C}$ ) NMR alapú eljárást, amely segítségével egy fehérje úgynevezett „rejtett” téralkatának bizonyos NMR paraméterei meghatározhatóvá válnak. (Rovo és mts. 2013, VIP munkánk a Chem.EurJ. címlapjára került) A Tc5b minifehérje szekvenciájából kiindulva in silico módszerekkel olyan pontmutánsokat terveztünk, amelyekről joggal várhattuk el, hogy a fent említett téralkatukat elvesztve rendezetlen fehérjeként viselkedjenek. A tervezett mutánsok közül többet sikeresen elő is állítottunk bakteriális expressziós rendszerekben, majd több spektroszkópai módszerrel jellemeztük téralkatukat (pl. CD- és NMR). Eredményeink alapján a tervezési koncepciónk sikeresnek bizonyult, mivel a kapott rövidebb polipeptidek a rendezetlenség jól használható modellvegyületeinek bizonyultak. Itt érdemes megjegyezni, hogy egy esetleges (tehát nem tervezett) mutáció következtében leggyakrabban nem belsőleg rendezetlen, azaz igen dinamikus molekuláris rendszert kapunk, hanem egy nehezen jellemezhető olyan térszerkezeti sokaságot, amely makroszkopikus szinten amorf rendszerként aposztrofálható. A tudományos eredményünk ebben az esetben tehát nem az, hogy egy rendezett téralkatot el tudunk „rontani” egy alkalmas mutációval, hanem az, hogy akár egyetlen aminosav csere eredményeként a rendezett fehérjék „világából”, a belsőleg rendezetlen fehérjék „világába” tudunk átugrani.

ECD, NMR és VCD mérések segítségével sikerült egy olyan 3 tagból álló, minifehérje-alapú molekuláris rendszert kifejlesztünk és előállítanunk, amely család első tagja belsőleg rendezetlen, a második fokozott aggregációs képességgel rendelkezik a pH, a koncentráció és az inkubációs hőmérséklet függvényében, míg a 3. tagja a családnak nem aggregálódó, időátlagban stabil, jól definiált 3D téralkattal rendelkezik. E család 3 kulcseleme tehát pusztán néhány mutációval egymásba alakítható, s az újonnan kifejlesztett modellek segítségével, IR, VCD és ECD mérések alapján például tanulmányozni tudtuk az alfa-hélix béta-redő konformációs átalakulás molekuláris részleteit. (Farkas és mts. 2013) A korábban említett rendezett, rendezetlen és aggregálódó fehérjék elkülönült világát összekötő modellrendszerek lehetővé tették kis méretük miatt (20-30 aminosav), hogy meghatározzuk az állapotok számos fizikokémiai paraméterét, ezzel is segítve a nagyobb fehérjék besorolását és jellemzését.

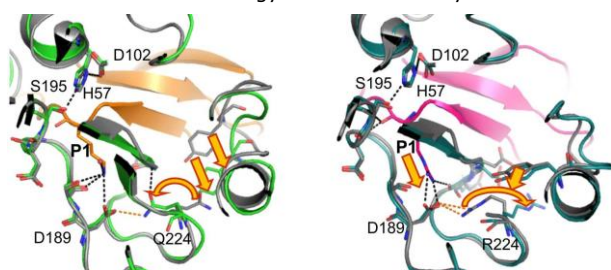


**Ábra 1.** A „hagyományos” NMR szerkezeti sokaság kibővíthető a molekula belső dinamikáját leíró adatokkal, megteremtve ezzel a „Dynamic Structure-Activity Relationships” fogalom szerkezeti hátterét.

A gyors és anyagtakarékos CD módszerek kvantitatív értelmezését segíti a csoportunkban korábban kidolgozott és mára igen népszerűvé vált CCA+ algoritmus, amelyet folyamatosan fejlesztünk. (Jákli és Perczel 2009) A korábban fehérjékre alkalmazott algoritmust jelen munkánk során a rövidebb peptidok és foldamerek konformációs feltérképezésére használtuk. A több száz laborban világszerte használt programcsomag lehetőséget nyújt olyan molekulás rendszerek elemzésére is, ahol számottevő, vagy éppen csak csekély térszerkezet-változást lehet észlelni a hőmérséklet, a pH, az oldószer vagy az ionerősség (stb.) függvényében. (<http://www.chem.elte.hu/departments/protnmr/cca/>)

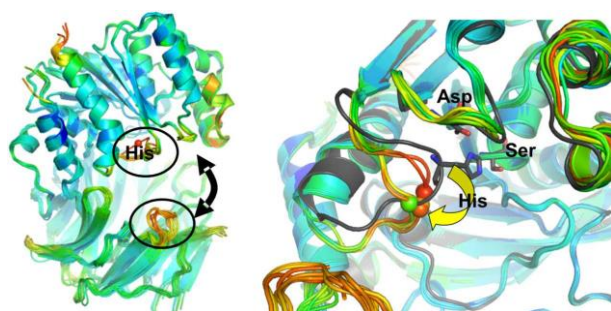
- 2) Bár az említett minifehérje a cukorbetegség gyógyításában klinikai szinten is használt Exenatid integráns része, s a proteáz inhibitorok is – ahogy az nevükből is kiderül – bioaktív vegyületek, kutatásaink során gyakorlati szempontból fontos nagyobb molekulatömegű fehérjék térszerkezetével is foglalkoztunk. Explicit módon megadtuk a komplementrendszer C1r proteázának CCP1 és CCP2 moduljainak dinamikai jellemzőit ( $R_1$ ,  $R_2$ , hetNOE alapon  $S_2$ ,  $\tau_{\text{auc}}$ , stb.). A  $^{15}\text{N}$  relaxációs NMR vizsgálataink eredményei, a biokémiai vizsgálatokkal összhangban arra utalnak, hogy a két modul a korábbi hiedelmekkel ellentétben nem független

egymástól. A CCP1 feltekeredését és dinamikáját jelentősen befolyásolja a hozzá kovalensen kötött CCP2 fehérje modul fizikai közelsége. Ennek ismeretében javaslatot tettünk e két fehérjedomén lehetséges kölcsönhatást befolyásoló szerepére, nevezetesen arra hogy az egyik modul valamely hurokrégiójához kötődő partnermolekula áttételesen befolyásolhatja a szomszédos modul kötő-felületének dinamikáját. Ezáltal megváltozik a modulok más partnerekhez való affinitása is, s mindennek szerepe lehet az autoaktiváció fontos, s máig nem értett molekuláris mechanizmusához. A két modul kölcsönhatását részletesen jellemeztük, a relatív orientációjuk, s „fej-láb illeszkedésük” (Láng és mts. 2010/1 és Láng és mts. 2010/2) összhangban van az alább leírt kristallográfiai vizsgálatok eredményeivel is. Szintén a komplement rendszer moduláris enzime a MASP-1 fehérje, mely biológiai funkciója korábban tisztázatlan volt. Feltehetőleg kapcsolatot teremt a véralvadási és komplement kaskádrendszerek között. Röntgenkristallográfiai eredményeink rávilágítottak a MASP-1 rokon enzimeinél szélesebb szubsztrát szelektivitásának szerkezeti alapjaira (Dobó és mts. 2009), mely felismerés egyben megteremtette a szelektív inhibitorok racionális tervezésének lehetőségét is. Enzim-inhibitor kölcsönhatások röntgenkristallográfiai elemzése során sikerült rávilágítani MASP-1 és a rokon MASP-2 fehérjék ellen in vitro evolúciós módszerrel kifejlesztett SGPI típusú inhibitorok specificitásának szerkezeti hátterét. Ennek során a két rokon enzim eltérő viselkedésére derült fény: a MASP-2 esetén az inhibitor-kötés során allosztérikus változások mennek végbe az enzimből, míg a MASP-1 esetén ugyanez a folyamat nem igazolható. (Héja és mts. 2012)



**Ábra 2.:** Konformációs változások MASP-2 (zöld) és MASP-1 (világoskék) enzimekben specifikus SGMI típusú inhibitorok (narancs és lila) kötődése során. A komplexátlatlan enzimformákat szürkével ábrázoltuk.

Az *Aeropyrum pernix* acilaminoacil peptidáz (AAP) enzim röntgenkristallográfiai vizsgálata során több kristályszerkezet elemzése során az enzim két, más-más funkciót betöltő alakkonformációját figyeltük meg: a nyitott és a zárt formát. A legnagyobb különbség a szubsztrát katalitikus helyhez való hozzáférésében és a katalitikus hely konformációjában rejlik. Megállapítottuk, hogy e téralkatok dinamikus jelleggel hordoznak: egyrészt az enzim kinyílása-összecukódása határozza meg, hogy katalitikusan aktív-e a szerkezet (nyitott: inaktív, csukott: aktív), másrészt az inaktivitást a katalitikus hisztidint hordozó régió mozgékonyvá és rendezetlenné válása okozza. Megállapítottuk, hogy nem a szubsztrát kötése határozza meg a katalitikus triád aktív konformációjának kialakulását, hanem csak stabilizálja a csukott/aktív formát. Ezen eredményeink alapján kiderült hogy a közel 600 aminosavból felépülő AAP enzim működésében a konformer-szelekció ugyanúgy meghatározó jelentőséghez jut, (Harmat és mts. 2011) mint azt fentebb már bemutattuk az alig 35 aminosavból felépülő SGTI és SGCI inhibitorok enzimgátlása során.



**Ábra 3.:** Az AAP nyitott formája, több kristályszerkezet összevetése. A nyitott formára jellemző a két domén eltávolodása következtében hozzáférhető aktív hely (katalitikus triád jelölve), és a mozgékonyvá vált

hisztidint tartó hurok (mozgékonyság: alacsony: kék, magas: piros). A bal oldali ábrán a csukott forma konformációját szürkével feltüntettük referenciaként.

Meghatároztuk a *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz enzim két mutáns formájának térszerkezetét. A két molekula közül az egyik mutánsban a dUTPáz konzervált 1-es motívumában egy Asp Asn cseréje történt, míg a másik esetben a C-terminális volt lerövidítve. A 3D téralkat meghatározása egyértelműen rámutatott, hogy a konzervált Asp, a korábbi feltételezésekkel ellentétben nem a  $Mg^{2+}$ -kötésben, hanem az alegységek közötti kölcsönhatásban játszik fontos szerepet. Teszi ezt éppen a másik mutáns segítségével értelmezhető módon, nevezetesen a C-terminális alegység konzervált 5-ös motívumával való kölcsönhatása révén. (Takács és mts. 2010) A homotrimer dUTP-áz egyik konzervált Asp-ja stabilizálja az enzim funkcionálisan fontos C-terminális szegmensének térszerkezetét. A 31P NMR méréseink alapján megállapíthattuk, hogy az enzimműködés során a nukleofil támadás  $Mg^{2+}$  jelenlétében, az  $\alpha$  foszforatomon következik be. (Barabás és mts. 2013) (Beke-Somfai és mts. 2010/2) Végezetül megvizsgáltuk a szubsztrát uracil-gyűrűjének stabilizálásáért felelős konzervált aromás aminosav szerepét a hidrolízis alkalmával. Az Ala- és Trp-mutánsok térszerkezet-meghatározása rávilágított arra, hogy sem a szubsztrát, sem a katalitikus apparátus geometriája nem változott meg ezen mutációk következtében. Érdekes módon a változás elsősorban a fehérje hidratációs héját érinti: az alaposan átrendeződik. Eredményeink szerint tehát az aromás kölcsönhatás az enzimreakció átmeneti állapotának stabilizálásához járul hozzá. (Pécsi és mts. 2010)

Az idáig vizsgált makromolekuláris rendszerek között a kalmodulin fehérje tekinthető talán a legdinamikusabb rendszernek, hiszen két doménjének egymáshoz viszonyított relatív orientációja komplexálatlan állapotban dinamikus, nagymértékben változó. Éppen e két domén között fennálló és fokozott szintű mobilitást, valamint a kölcsönható ligandumhoz való konformációs adaptálódási képességet vizsgáltuk természetes, lipid jellegű gátlószerek segítségével. Az oldatbeli vizsgálatok tanúsága szerint e lipid-fehérje kölcsönhatás kétféle folyamat eredménye. Ugyanakkor a kötődés és orientációs folyamat végeredményeként kialakuló szupramolekuláris állapotra jellemző a krisztallográfiával meghatározott térszerkezet. Ezen jól látható, hogy a kalmodulin mindkét, amúgy egymástól majdnem függetlenül mozgó doménje megköti a lipid láncoknak ugyanazt a kötegét (Kovács és mts. 2010) és ezzel csökkenti a fehérje belső mozgékonyosságát.

- 3) A globuláris fehérjék népes családja mellett ma már tudjuk, hogy számos olyan fehérje is létezik, s sejtes rendszerekben aktív szerephez jut, amelyek úgynevezett rendezetlen (angolul intrinsically unstructured/dynamic protein, röviden IUP/IDP) jelleget mutat. Az IUP/IDP-k olyan funkcionálisan fontos makromolekulák, amelyek szabad állapotukban, azaz más fehérjékhez nem kötődve, igen nagyszámú, körülbelül azonos belső energiájú téralkatot vehetnek fel. Ezen milliárdnyi konformációs állapot gyors cseréje az, amit a „rendezetlen” jelző takar. Ilyen fehérje például a kalpasztatin, a kalpain fehérje természetes endogén inhibitora. Biológiai szempontból a kalpain azért is érdekes, mert fontos szerepet tölthet be az emberei agyban tárolt információk molekuláris szintű rögzítésében. Megvizsgáltuk és NMR spektroszkópiai módszerekkel jellemeztük a kalpasztatin szerkezeti sokszínűségét, IUP jellegét, majd meghatároztuk az inhibitor fehérje különböző időskálájú fragmentált belső mozgását (15N-NMR relaxációs mérésekkel). Kimutattuk, hogy bár a téralkat igen dinamikus a ns-ps időskálán, rövidebb másodlagos szerkezeti elemekkel (jelen esetben hélixekkel) mégis rendelkezhet az inhibitor némely fragmense. (Kiss és mts. 2008/2) Ezt követően elvégeztük a kalpasztatin kalpain gátló képességének molekuláris megértését szolgáló NMR-méréseket és feltérképeztük a kölcsönhatás molekuláris részleteit is. Megállapítottuk, hogy a kalpainhoz kötődés több egymás utáni lépésben valósul meg, amely során két régiója - az A és a C - bekötődése az enzim alkalmas pontjaihoz a gátlási folyamat első és egyben kulcslépése. Sikertült az inhibíció első lépéseit egyértelműen jellemeznünk, s rámutatni e folyamat során is a szerkezet és dinamika kulcsfontosságára. (Kiss és mts. 2008/1)

A korábban leírt kalpasztattinnal összemérhető belső mozgékonyssággal rendelkező IDP szerű makromolekula az ERD14 (Early Response to Dehydration 14), egy növényi stresszfehérje, mely azonban szintén tartalmaz több rövid másodlagos szerkezeti elemet. Alkalmas 3D és 5D NMR mérések segítségével elvégeztük az ERD14 (195 aminosav) teljes szekvencia hozzárendelését (Ágoston és mts. 2011), valamint áttörést értünk el az „in cell” NMR spektroszkópia területén is (Ágoston és mts. Scinece 2013 beküldve).

A pályázat keretében vizsgált további IUP/IDP rendszerünk volt még a TPPP (Tubulin Polymerization Promoting

Protein) P25. NMR mérések segítségével meghatároztuk a P25 GTP- (GXXXGK szekvencia),  $Zn^{2+}$ - (C-terminális), illetve a miozin fragmens dinein könnyű láncát kötő régióit. A TPPP/p25 fehérje GTP-áz aktivitásának bizonyítása egy alaposan átgondolt és ügyesen kivitelezett NMR-méréssor alapján történt meg. Ezen aktivitás  $Mg^{2+}$  függést mutat, mely jelenség erőssége összevethető a kisebb G-fehérjék specifikus GTPáz aktivitásával. Eredményeink új megvilágításba helyezik a rendezetlen fehérjék enzimaktivitásával kapcsolatos elterjedt nézeteket és új irányokat nyitnak a TPPP/p25 fehérje kutatásában. (Zotter és mts. 2011/1) Meghatároztuk továbbá a TPPP/p25  $Zn^{2+}$ -ion kiváltotta „szerkezetváltozást”, amely egy belsőleg dinamikus fehérje esetében különleges kihívás. Kimutattuk hogy GTPáz aktivitás és a mikrotubulus asszociációra gyakorolt hatások szorosan összefüggnek. (Zotter és mts. 2011 / 2)

- 4) Vannak olyan, a fehérjék fel- és letekeredését érintő stabilitási kérdések, vagy a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire visszavezethető kérdéskörök, amelyek elsősorban in silico számítógépes módszerekkel (MM, MD, QM, QM/MM, stb) válaszolhatók meg eredményesen. Ezért például a neurodegeneratív betegségek során megfigyelt amiloid szálképződés fordított folyamatát kvantumkémiai (QM) számolások segítségével vizsgáltuk. Azért tanulmányoztuk QM szinten a  $\beta$ -redőzött rétegek kitekeredését vízmolekulák jelenlétében, hogy a kapott stabilitási és termodinamikai eredmények kellően megbízhatók legyenek. Megállapítottuk, hogy parallel rétegek esetében a szálak közötti belső H-kötéseket már egyetlen vízmolekula is képes szétnyitni. Eredményeink az eltemetett H-kötések entalpiikus stabilizáló szerepére utalnak. (Beke-Somfai és mts. 2010/1) Kísérleti adataink által inspirálva megvizsgáltuk a polipeptidlánc aggregációja során csökkenő szabadsági fokok és a molekuláris rendszer entrópia-változásának mibenlétét, nagyságát és módját. Megállapítottuk, hogy míg az entrópiikus tag az aggregáció ellen dolgozik, addig a kedvező entalpiikus tag szükségszerűen túlkompenzálja az előbbit és ezért összességében az aggregáció termodinamikai szempontból kedvező folyamatnak tekintendő, minek okán a fehérje fragmensek összetapadása úgy tűnik hogy előbb vagy utóbb de szükségszerűen bekövetkezik. (Pohl és mts. 2012)

A különböző téralkatok stabilitásvizsgálatát követően alkalmas QM módszerek segítségével kiszámítottuk a legfontosabb polipeptid gerinc-konformerek karakterisztikus NMR kémiai eltolódás (CSA) értékeit is, majd a kapott számításos eredményeket összevetettük a kísérletes NMR adatokkal. A számolt és kísérleti adatok korrelációja során szignifikáns összefüggést találtunk, mely jelenség jól mutatja, hogy a lokális CSA értékek jelentősen függenek a polipeptidlánc térszerkezetének milyenségétől és így, ezek kölcsönösen informatívak egymásra nézve. (Czajlik és mts. 2011) Ezen adatok fényében lehetőség nyílik arra, hogy csupán a fehérjék rezonancia frekvenciáinak ismerete (csak CSA) alapján gyors, ám mégis megbízható térszerkezeti besorolásokat végezzünk. (E módszert a „no NOE” eljárásaként találhatjuk a szakirodalomban.). (A stabilitás és szerkezeti mozgékonyosság, valamint a mérhető NMR-adatok meghatározása nem csak poliamid rendszerek esetében lehet informatív, hanem szénhidrátok esetében is hasznosnak mutatkozott. (Kövér és mts. 2009), (Zsoldos-Mády és mts. 2011))

Kidolgoztuk és webszerver formájában publikussá tettük a CoNSEnsX (Compliance of NMR-derived Structural Ensembles with eXperimental data) eljárást, amely kifejezetten alkalmas a belső dinamikát tükröző fehérjeszerkezeti sokaságok elemzésére. A módszer a konformerek koordinátáiból „visszaszámol” számos, NMR-spektroszkópiából származtatható kísérleti paramétert, és azokat összeveti a tényleges mért értékekkel. A szerver saját kód mellett integráltan használ széles körben elfogadott eljárásokat egyes paraméterek visszaszámolására. A módszer újszerűsége, hogy az egyes konformerekre kapott értékeket megfelelően átlagolja, és ilyen módon a teljes sokaságra vonatkozó adatokat veti össze a kísérletekkel, így a gyakorlatban alkalmazva azt az alapelvet, miszerint a mért NMR-paraméterek mindig konformerek átlagából származnak. (<http://consensx.chem.elte.hu>, Ángyán és mts. 2010)

A természetes  $\alpha$ -aminosavakból felépülő fehérjék konformációs alaptulajdonságainak jobb megértését segíti az a kutatási irány is, amely során  $\beta$ -aminosavakból felépülő polimerek konformációs tulajdonságait vizsgáljuk. (Ez utóbbi rendszerek biokompatibilis és biodegradábilis voltak miatt rendkívüli előnyökkel kecsegtetnek. Ilyen és hasonló kémiai összetételű makromolekulákat már ma is használnak például a felszívódó sebészeti cérna, vagy a szívbillentyűk előállításánál.) Molekulamodellezés segítségével megállapítottuk, hogy  $\beta$ -Ala és hasonló monomerekből vélhetőleg igen könnyen lehet nanocsöveket készíteni, mivel ezek a molekuláris formák termodinamikailag igen kedvezményezettek. (Czajlik és mts. 2008) Az  $\alpha$ -

és  $\beta$ -peptidek konformációelemzése rámutatott arra, hogy a  $\beta$ -peptidek nyújtott térszerkezete gyakran kedvezményezett. Sikertelenül eddig ismeretlen új konformereket (ún. apoláris redők) azonosítanunk, amelyek felfoghatók a fehérjékben található  $\beta$ -redőzött rétegek analógjaiként. Ezen szerkezetek nem alkotnak nano csöveket, hanem inkább síkalkatúak, új lehetőséget nyitva ezzel a biokompatibilis anyagok tervezése terén. (Pohl és mts. 2010) A fent tervezett molekuláris rendszerek építőelemeinek kísérleti vizsgálata során felvettük két modell  $\beta$ -peptid, az N-acetil-3-aminopropionsav-N'-metilamid (Ac- $\beta$ -HGly-NHMe) és az N-acetil-3-aminobutánsav-N'-metilamid (Ac- $\beta$ -HAla-NHMe), IR spektrumát alacsony hőmérsékletű Ar és Kr mátrixokban. Mérésink megerősítették a korábbi QM alapú számítások során kialakult elképzeléseinket, nevezetesen, hogy a  $\beta$ -aminosavaknak kevesebb térszerkezeti építőelemük van, mint az  $\alpha$ -aminosavaknak. (Beke-Somfai és mts. 2010/3)

Továbbfűzve az alfa-aminosavakból felépülő és önszerveződő térszerkezeti elemekkel kapcsolatos korábbi vizsgálatainkat, a kollagén első hidratációs rétegében kötődő vízmolekulák kötődési stabilitását vizsgáltuk QM számítások alapján. Azt találtuk, hogy számottevő energiavesztés nélkül elmozdítható vízmolekulák borítják a kollagén elemi szálának felületét, amely megállapítás összhangban van a tropokollagén már ismert tulajdonságaival. (Pálfi és Perczel 2010) Mindez azért is érdekes, mert ahogy korábban az dUTPáz fehérje esetében is azt találtuk hogy egyes mutációk nem feltétlenül a makromolekula téralkatát, de az azt hidratáló vizek szerkezetét befolyásolják, úgy ebben az esetben is a hidratáló vízburok fontossága vált világossá. Többféle szekvencia adatbázisban szisztematikusan megvizsgáltunk számos, „coiled-coil” és rendezetlen szerkezetek felismerésére alkalmas programot. Számos kereszt-predikciót találtunk, melyeknek fehérjeevolúciós jelentősége is lehet. (Szappanos és mts. 2010)

## Összefoglalás

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy tudományos eredményeink a fehérje térszerkezet és dinamikus belső mozgásuk, valamint biológiai funkciójuk kapcsolata terén elméleti és alapkutatás jellegű, ám számos érdekes és fontos gyakorlati aspektussal van övezve. A leírt tudományos eredmények egyszerre specifikusak és fehérjefüggetlenségűek (33 angol nyelvű közlemény (IF=116,984)), ám ugyanakkor hozzájárulnak a fehérje tudomány „nagy” kérdéseinek megoldásához is. Új algoritmusokat és adatbáziskezelő-rendszereket hoztunk létre és adtunk közre azért, hogy helyesebben használjuk a meglevő „terabyte”-nyi adatokat. Új NMR alapú módszert dolgoztunk ki az alacsony betöltöttségű, más szóval rejtett téralkatok elemzésére. Új kvantumkémia eredmények segítségével bizonyítottuk a béta-aminosavak használhatóságát a vegyes, illetve „foldamer” peptidek terén. Jelen kutatásainknak köszönhetően olyan fontos biológiai rendszerek alkotóelemeiről tudtunk meg többet, amelyek kapcsolatba hozhatók a 2-es típusú cukorbetegség klinikai kezelésével, az Alzheimer- és más neurodegeneratív-kórok, az agyvérzés utáni állapot jövőbeni klinikai kezelésével, vagy akár a növények szárazságtűrését fokozó „stressz” fehérjékkel, stb.. Esetenként akár hatóanyag optimalizálást is végeztünk (pl. Ex-4), míg más esetben a jövőbeli beavatkozás molekuláris hátterét kívántuk jobban feltárni, alaposabban megérteni.

## Hivatkozások jegyzéke:

CZAJLIK, A BEKE, T BOTTONI, A PERCZEL, A: **Structure and stability of short beta-peptide nanotubes: A non-natural representative of collagen?**, Journal of Physical Chemistry B 2008 112(26): 7956-7966

KISS, R BOZÓKY, Z KOVÁCS, D RÓNA, G FRIEDRICH, P DVORTSÁK, P WEISEMANN, R TOMPA, P PERCZEL, A: **Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain**, FEBS Letters 2008 582(15): 2149-2154

KISS, R KOVÁCS, D TOMPA, P PERCZEL, A: **Local structural preferences of calpastatin, the intrinsically unstructured protein inhibitor of calpain**, Biochemistry 2008 47(26): 6936-6945

Beke, T Somlai, Cs Magyarfalvi, G Perczel, A Tarczay: **Chiral and achiral fundamental conformational building units of  $\beta$ -peptides: Isolation conformational study on Ac- $\beta$ -HGly-NHMe and Ac- $\beta$ -HAla-NHMe.**, J. Phys. Chem. B 2009, 113:7918-7926

Dobó, J Harmat, V Beinrohr, L Sebestyén, E Závodszy, P Gál: **MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity**, J. Immunol. 2009, 183:1207-1214

Jákli, I Perczel: **A The inherent flexibility of peptides and protein fragments quantitized by CD in conjunction with CCA+,** J. Pept. Sci. 2009, 15(11): 738-752

Kövé, KE Lipták, A Beke, T Perczel, A: **Combined NMR three-bond scalar coupling measurements and QM calculations to calculate OH-rotamer equilibrium of polyalcohols.,** J. Comput. Chem. 2009, 30:540-550

Ángyán AF, Szappanos B, Perczel A, Gáspári Z: **CoNSENsX: an ensemble view of protein structures and NMR-derived experimental data,** BMC Struct. Biol., 2010, 10: 39

Beke-Somfai, T Lincoln, P Nordén, B: **Mechanical control of ATP synthase function: Activation energy difference between tight and loose binding sites.,** Biochemistry 2010, 49: 401-403

Beke-Somfai, T Perczel A: **Zipper-like unfolding of  $\beta$ -sheets accessed by pioneer water molecules: Atomic resolution of forced unfold reveals different mechanisms for parallel and antiparallel motif,** J. Phys. Chem. Lett. 2010, 1:1341-1345

Dhir S, Pacurar M, Franklin D, Gáspári Z, Kertész-Farkas A, Eisenhaber F, Pongor S: **Detecting atypical examples of known domain types by sequence similarity searching: The SBASE domain library approach,** Curr. Prot. Pept. Sci. 2010, 11, 538-549

Gáspári Z, Ángyán AF, Dhir S, Franklin D, Perczel A, Pinter A, Pongor S: **Probing dynamic protein ensembles with atomic proximity measures,** Curr. Prot. Pept. Sci., 2010 11, 512-522

Gáspári Z, Perczel A: **Protein dynamics as reported by NMR,** Annu. Rep. NMR, 71, pp. 35-75 (szerk.: Graham Webb), Academic Press, 2010

Gáspári Z, Várnai P, Szappanos B, Perczel A: **Reconciling the lock-and-key and dynamic views of canonical serine protease inhibitor action,** FEBS Lett., 2010 584:203-206

Kovács E, Harmat V, Tóth J, Vértessy BG, Módos K, Kardos J, Liliom K: **Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions,** 1.FASEB J., 24, 3829-3839., 2010

Láng A, Major B, Szilágyi K, Gáspári Z, Gál P, Závodszy P, Perczel A: **Interaction between separated consecutive complement control modules of human C1r: Implications for dimerization of the full-length protease.,** FEBS Lett., 2010 584, 4565-4569

Láng A, Szilágyi K, Major B, Gál P, Závodszy P, Perczel A: **Intermodule cooperativity in the structure and dynamics of consecutive complement control modules in human C1r,** FEBS J., 277, 3986-3998, 2010

Pálfi KV, Perczel A: **Stability of the Hydration Layer of Tropocollagen: A QM Study,** J. Comput. Chem., 2010 31, 764-777

Pécsi I, Leveles I, Harmat V, Vértessy BG, Tóth J: **Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase,** Nucl. Acids Res., 2010 38, 7179-7186

Pohl G, Beke T, Csizmadia IG, Perczel A: **Extended apolar beta-peptide foldamers: the role of axis chirality on beta-peptide sheet stability,** J. Phys. Chem. B., 2010 114, 9338-9348

Szappanos, B Süveges, D Nyitrai, L Perczel, A Gáspári, Z: **Folded-unfolded cross-predictions and protein evolution: The case study of coiled-coils.,** FEBS Lett., 2010, 584:1623-1627

Takács E, Nagy G, Leveles I, Harmat V, Lopata A, Tóth J, Vértessy BG: **Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases,** FEBS Lett., 2010 584, 3047-3054

Ágoston, BS Kovács, D Tompa, P Perczel, A: **Full backbone assignment and dynamics of the intrinsically disordered dehydrin ERD14,** BIOMOLECULAR NMR ASSIGNMENTS, 2011, 5, 189-193

Harmat V, Domokos K, Menyhárd DK, Palló A, Szeltner Z, Szamosi I, Beke-Somfai T, Náray-Szabó G, Polgár L: **Structure and catalysis of acylaminoacyl peptidase: closed and open subunits of dimer oligopeptidase,** J. Biol. Chem. 2011, 286, 1987-1998

Rovó, P Farkas, V Hegyi, O Szolomajer-Csikós, O Tóth, GK Perczel, A: **Cooperativity network of Trp-cage miniproteins: probing salt-bridges,** Journal of Peptide Science, 2011, 9, 610-619

Zotter Á, Bodor A, Oláh J, Hlavanda E, Orosz F, Perczel A, Ovádi J: **Disordered TPPP/p25 binds GTP and displays Mg2+-dependent GTPase activity.,** FEBS Lett., 2011, 585, 803-808

Zotter, Á Oláh, J Hlavanda, E Bodor, A Perczel, A Szigeti, K Fidy, J Ovádi, J: **Zn(2+)-Induced Rearrangement of the Disordered TPPP/p25 Affects Its Microtubule Assembly and GTPase Activity,** Biochemistry, 2011, 50, 9568-9578

Zsoltos-Mády, V Pintér, I Perédy-Kajtár, M Perczel, A: **Transformation of aldose formazans. Novel synthesis of 2-acetamido-2-deoxypentanolactones and a new pent-2-enose formazan,** Carbohydrate Research, 2011, 346, 1534-1540

- Gáspári Z, Süveges D, Perczel A, Nyitrai L, Tóth G: **Charged single alpha-helices in proteomes revealed by a consensus prediction approach**, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS, 2012, 1824, 637-646
- Gorrea E, Pohl G, Nolis P, Celis S, Burusco KK, Branchadell V, Perczel A, Ortuño RM: **Secondary structure of short  $\beta$ -peptides as the chiral expression of monomeric building units: A rational and predictive model**, JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 2012, 77, 9795-9806
- Jákli I, Knak Jensen SJ, Csizmadia IG, Perczel A: **Variation of conformational properties at a glance. True graphical visualization of the Ramachandran surface topology as a periodic potential energy surface**, CHEMICAL PHYSICS LETTERS, 2012, 547, 82-88
- Pohl G, Beke-Somfai T, Csizmadia IG, Perczel A: **Exploiting diverse stereochemistry of b-amino acids: Toward a rational design of sheet-forming b-peptide systems**, AMINO ACIDS., 2012, 43, 735-749
- Pohl G, Jákli I, Csizmadia IG, Papp D, Matías GF, Perczel A: **The role of entropy in initializing the aggregation of peptides: A first principle study on oligopeptide oligomerization**, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, 2012, 14, 1507-1516
- Heja D, Harmat V, Fodor K, Wilmanns M, Dobo J, Kekesi KA, Zavodszky P, Gal P, Pal G: **Monospecific Inhibitors Show That Both Mannan-binding Lectin-associated Serine Protease-1 (MASP-1) and-2 Are Essential for Lectin Pathway Activation and Reveal Structural Plasticity of MASP-2**, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2012, 287, 20290-20300
- Leveles I, Rona G, Zagya I, Bendes A, Harmat V, Vertessy BG: **Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dUTPase from the phi 11 helper phage of Staphylococcus aureus**, 2011, ACTA CRYSTALLOGR F67, 1411-1413